

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίδραση στην κινητικότητα και στη βιωσιμότητα πριν και μετά την
κατάψυξη με τη μεθοδολογία του DNA fragmentation.**

**ΜΑΡΙΑ ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ
ΑΠΟΦΟΙΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2018

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Γεώργιος- Σπυρίδων Ανυφαντής
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Μάρα Σιμοπούλου
Επίκουρη Καθηγήτρια Πειραματικής Φυσιολογίας
Πανεπιστημίου Αθηνών

3^{ος} Εξεταστής

Αλέξανδρος Δαπόντε
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στον επιβλέπων Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας κ. Ανυφαντή Γεώργιο- Σπυρίδων για την καθοδήγηση και την άμεση και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω σε όλους τους Καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, καθώς με την πολυετή εμπειρία τους μου μετέδωσαν τις απαραίτητες γνώσεις αλλά και τις νεότερες εξελίξεις στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης καθώς και συγγραφής της εργασίας αυτής.

Αναγνώστου Μαρία

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Σεπτέμβριος 2013- Σεπτέμβριος 2017

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

01 Ιουλίου 2015- 31 Αυγούστου 2015

Εκπαιδευόμενη σε Μικροβιολογικό εργαστήριο στη Λάρισα (έμμισθη πρακτική
άσκηση)

Από τον Σεπτέμβριο 2017 έως σήμερα, παρακολουθώ το μεταπτυχιακό της
Βιολογίας της Αναπαραγωγής και συμμετέχω σε όλους τους κύκλους εκπαίδευσης
του μεταπτυχιακού που λαμβάνουν χώρα στη Μονάδα Υποβοηθούμενης
Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού
Νοσοκομείου Λάρισας.

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ
ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ
ΤΟΥ DNA fragmentation.»**

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Γεώργιος- Σπυρίδων Ανυφαντής

Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Σύμβουλος :

Μάρα Σιμοπούλου

Επίκουρη Καθηγήτρια Πειραματικής Φυσιολογίας
Πανεπιστημίου Αθηνών

Μέλος :

Αλέξανδρος Δαπόντε

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην αναπαραγωγική ιατρική και έχει ως στόχο τη διατήρηση και προστασία της γονιμότητας σε διάφορες περιπτώσεις, όπως στην υπογονιμότητα και στις θεραπείες κακοήθειας. Ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την ανδρική γονιμότητα είναι ο κατακερματισμός του DNA (Sperm DNA Fragmentation, SDF) των σπερματοζωαρίων. Παρόλο που αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος, η επίδρασή της στην ακεραιότητα του DNA παραμένει ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την επίδραση της κρυοσυντήρησης στη βιωσιμότητα και στο κατακερματισμό του DNA του σπέρματος. Για την επίτευξη της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δεκαπέντε δείγματα σπέρματος. Η κινητικότητα των δειγμάτων εκτιμήθηκε αμέσως μετά τη συλλογή τους σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του WHO 2010 και μετά την κρυοσυντήρηση. Ο κατακερματισμός του DNA είναι η δεύτερη παράμετρος που αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το Halosperm® G2 kit. Η συγκεκριμένη μέθοδος εκτιμά τη διασπορά της χρωματίνης και ανάλογα με τη διασπορά εκτιμήθηκε ο βαθμός του κατακερματισμού του DNA. Παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση ($p < 0,05$) της προωθητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη ($56,8\% \pm 2,6$ vs $28,7\% \pm 3,1$). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του ποσοστού του κατακερματισμένου DNA ($34,3\% \pm 1,1$ vs $48,6\% \pm 1,1$) ($p < 0,05$). Επίσης, σημειώθηκε μια συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των κινητών σπερματοζωαρίων και του ποσοστού του SDF. Προτείνεται ότι η κρυοσυντήρηση έχει αρνητικές συνέπειες στα σπερματοζωάρια, τόσο στην κινητικότητα όσο και στην ακεραιότητα του DNA τους.

Summary

Cryopreservation of sperm is a widely used technique to maintain and protect the fertility in various occasions such as infertility and malignancy treatments. One of the main factors affecting male infertility is DNA fragmentation in sperm. Although many studies have focused on the impact of cryopreservation on sperm parameters, its effect on the integrity of DNA remains a controversial subject. The aim of this study was to investigate the effect of cryopreservation on sperm viability and sperm DNA fragmentation (SDF). Fifteen semen samples were used for the purpose of the study. Sperm motility was evaluated at collection time according to WHO 2010 guidelines and after cryopreservation. DNA fragmentation was evaluated with Halosperm® G2 kit. The diagnostic test used (SCD) is a lightweight and fast test based on the sperm chromatin dispersion. After cryopreservation, a significant decrease in sperm progressive motility was observed ($56.8\% \pm 2.6$ vs $28.7\% \pm 3.1$) ($p < 0.05$). Similar results were obtained in the case of DNA fragmentation ($34.3\% \pm 1.1$ vs $48.6\% \pm 1.1$) ($p < 0.05$). A correlation between motile spermatozoa and SDF of post-thaw semen samples was also noted. Conclusively, cryopreservation has deleterious effects on spermatozoa, especially on their motility and their DNA integrity.

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	9
1. Ορισμός κρυοβιολογίας	9
2. Βασικές αρχές κρυοσυντήρησης σπέρματος	9
3. Αιτίες κατάψυξης σπέρματος.....	10
4. Μέθοδοι κατάψυξης και απόψυξης	12
5. Μηχανισμοί βλάβης των σπερματοζωαρίων από την κατάψυξη.....	13
6. Επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος και στη γονιμοποιητική του ικανότητα.....	17
6.1 Επίδραση της κρυοσυντήρησης στο μεταβολισμό των σπερματοζωαρίων.....	17
6.2 Επίδραση της κρυοσυντήρησης στη γονιμοποιητική ικανότητα σπέρματος.....	19
6.3 Γονιμότητα και ποσοστά κύησης κατεψυγμένου σπέρματος	20
7. Επίδραση της κρυοσυντήρησης στην ακεραιότητα του DNA του σπέρματος.....	21
7.1 Μέθοδοι αξιολόγησης της ακεραιότητας του DNA	23
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

1. Ορισμός κρυοβιολογίας

Ο τομέας της κρυοβιολογίας έχει υποστεί τεράστια πρόοδο τα τελευταία 60 χρόνια. Αυτή η τάση συνεχίζει να υπάρχει καθώς νέες τεχνικές αναπτύσσονται με γρήγορο ρυθμό, οι οποίες παρέχουν νέες ευκαιρίες όσο αφορά την αναπαραγωγή στον άνθρωπο και στα ζώα. Ως κρυοβιολογία ορίζεται η επιστήμη που περιγράφει τις επιδράσεις που έχει η χαμηλότερη του μηδενός θερμοκρασία στους ζωντανούς οργανισμούς/ κύτταρα ή αλλιώς η επιστήμη που ασχολείται με τη συντήρηση οργανισμών/ κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα και κάποιες ομάδες ιστών συντηρούνται σε θερμοκρασίες από -80°C έως -196°C ενώ τα όργανα και οι περισσότεροι ιστοί συντηρούνται σε υποθερμικούς κυρίως βαθμούς ($> 0^{\circ}\text{C}$ και $< 37^{\circ}\text{C}$). Στο πλαίσιο της κρυοβιολογίας των αναπαραγωγικών κυττάρων (ωοκυττάρων, σπερματοζωαρίων), των εμβρύων, των βλαστομεριδίων και των αναπαραγωγικών ιστών (ωοθηκικός, ορχικός ιστός), η κρυοσυντήρηση σπέρματος έχει τη μεγαλύτερη ιστορία και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην αναπαραγωγική ιατρική, λόγω της υψηλής κρυοανθεκτικότητας του καθώς και των υπάρχοντων πρωτοκόλλων. Ένα από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνολογίας της κρυοβιολογίας είναι ότι «παγώνει» το χρόνο καθώς προβλήματα όπως η ηλικία, ο θάνατος ή η απώλεια γονιμότητας έγιναν λιγότερο σημαντικά και πιο αντιμετωπίσιμα. Η κρυοβιολογία απέκτησε ακόμη μεγαλύτερη εφαρμογή στην προσπάθεια μείωσης των ποσοστών πολύδυμων κύσεων (Tiitinen *et al.*, 2012).

2. Βασικές αρχές κρυοσυντήρησης σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση αποτελεί έναν εφαρμοσμένο κλάδο της κρυοβιολογίας και ορίζεται ως η διαδικασία η οποία καθιστά δυνατή τη διατήρηση των κυττάρων σε κρυογονικές θερμοκρασίες. Κατά την κρυοσυντήρηση, αναστέλλεται η βιολογική δραστηριότητα των κυττάρων και κατά συνέπεια μπορούν να διατηρηθούν αναλλοίωτα για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Στην περίπτωση του ανθρώπινου

σπέρματος, το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επιτυχούς κρυοσυντήρησης που έχει αναφερθεί είναι τα 21 χρόνια.

Οι πρώτες προσπάθειες κρυοσυντήρησης σπέρματος καταγράφονται το 1776 από τον Spallanzani όπου πραγματοποίησε τη πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια κατάψυξης. Με το πέρασμα των χρόνων, επετεύχθη η επιβίωση των σπερματοζωαρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όμως, η πρόκληση για τα κύτταρα δεν ήταν αυτή αλλά η δυνατότητα να αντέχουν την αλλαγή θερμοκρασίας κατά τη ψύξη-απόψυξη καθώς οι ωσμωτικές αλλαγές που συνέβαιναν στην απόψυξη οδηγούσαν σε μεγάλο βαθμό στην καταστροφή των σπερματοζωαρίων. Αυτό το πρόβλημα άρχισε να λύνεται το 1949, όταν ο Polge παρατήρησε ότι η γλυκερόλη (διαπερατό διάλυμα) έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτή η ανακάλυψη αναφέρεται ως καθοριστική στιγμή για την καθιέρωση της σύγχρονης κρυοβιολογίας του σπέρματος. Ύστερα, το 1953 οι Sherman και Bunge πραγματοποίησαν απλή ψύξη σπερματοζωαρίων και αποθήκευση τους σε ξηρό πάγο (-75°C). Ο Sherman συνέχισε την έρευνα του με στόχο τη βελτίωση των μεθόδων κρυοσυντήρησης όπου το 1963, πραγματοποίησε κρυοσυντήρηση δειγμάτων σπέρματος σε υγρό άζωτο (-196°C) και παρατήρησε την υπεροχή της νέας αυτής τεχνικής, καθώς σε αυτή την περίπτωση αποφεύχθηκε η μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Στα χρόνια που ακολούθησαν μέχρι σήμερα, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων πρωτοκόλλων.

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος περιλαμβάνει την κατάψυξη και την απόψυξη σπερματοζωαρίων. Στην κατάψυξη, τα κύτταρα αφυδατώνονται και η φάση μετατροπής του νερού σε πάγο (η καλούμενη κρυσταλλοποίηση) θεωρείται η πιο κρίσιμη φάση σχετικά με την επιβίωση των κυττάρων μετά την απόψυξη. Η θερμοκρασία που επιτελείται αυτή η φάση μετατροπής έχει μικρό εύρος και η παραμονή των κυττάρων για διάστημα μεγαλύτερο από το απαιτούμενο ή η υπέρβαση αυτού του εύρους θερμοκρασιών μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη βλάβη του κυττάρου. Στην απόψυξη, τα κύτταρα ενυδατώνονται με αποτέλεσμα να υποβάλλονται σε σημαντικές υποτονικές βλάβες.

3. Αιτίες κατάψυξης σπέρματος

Ο σύγχρονος άνδρας καλείται να αντιμετωπίσει κάποιες αντίξοες καταστάσεις που ενδέχεται να απειλούν τη γονιμότητα του. Το άγχος, οι επιβαρυνμένες συνθήκες

του εργασιακού περιβάλλοντος, η παχυσαρκία, η μη ισορροπημένη διατροφή και κάποιες συνήθειες του καθημερινού τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα και η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ, αποτελούν μερικούς από τους πιθανούς λόγους που μπορεί να προκαλέσουν σταδιακή μείωση της ποιότητας του σπέρματος. Εκτός από τη μείωση της ποιότητας του σπέρματος, υπάρχουν και λόγοι υγείας που μπορεί να καθιστούν αναγκαία τη διατήρηση της γονιμότητας του άνδρα μέσω της κατάψυξης σπέρματος. Ακολουθώντας, παρατίθενται ορισμένοι λόγοι για τους οποίους οι άνδρες θα πρέπει να εξετάσουν την πιθανότητα κρυοσυντήρησης σπέρματος:

- Πριν από θεραπείες για καρκίνο. Η χημειοθεραπεία, η ακτινοβολία ή η χειρουργική επέμβαση με στόχο τη θεραπεία του καρκίνου μπορεί να οδηγήσουν σε μόνιμη στειρότητα και/ή υπογονιμότητα του ατόμου.
- Πριν από εγχείρηση προστάτη ή όρχεων. Η χειρουργική επέμβαση στους όρχεις ή η αφαίρεση του προστάτη μπορεί να προκαλέσει στειρότητα ή να συμβεί εκτροπή της ροής του σπέρματος προς την ουροδόχο κύστη.
- Όταν υπάρχει πρόθεση να πραγματοποιηθεί υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Το σπέρμα μπορεί να καταψυχθεί και να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για IUI¹ ή για εξωσωματική γονιμοποίηση μέσω IVF ή ICSI².
- Επαγγέλματα υψηλού κινδύνου. Η έκθεση σε χημικές ουσίες, ακτινοβολία και υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσουν σε στειρότητα.
- Χαμηλή ποιότητα σπέρματος (χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων)
- Προβλήματα εκσπερμάτισης
- Διατήρηση σπέρματος μετά από βιοψία όρχεων (TESE)³
- Απουσία του συζύγου ή άγχος. Η κατάψυξη σπέρματος επιτρέπει στη σύζυγο να συνεχίσει τον αναπαραγωγικό προγραμματισμό ακόμα και όταν ο σύζυγος είναι απών λόγω εργασίας (για παράδειγμα ναυτικός). Το άγχος ενδέχεται να οδηγήσει στην αδυναμία συλλογής σπέρματος τη στιγμή της ωοληψίας.

Αυτές είναι κάποιες καταστάσεις της ζωής, όπου η κατάψυξη σπέρματος προσφέρει τη δυνατότητα μελλοντικής διατήρησης της γονιμότητας καθώς και τη ψυχολογική ηρεμία του άνδρα.

¹ IUI: Intrauterine Insemination (ενδομήτρια σπερματέγχυση)

² IVF: In vitro fertilization

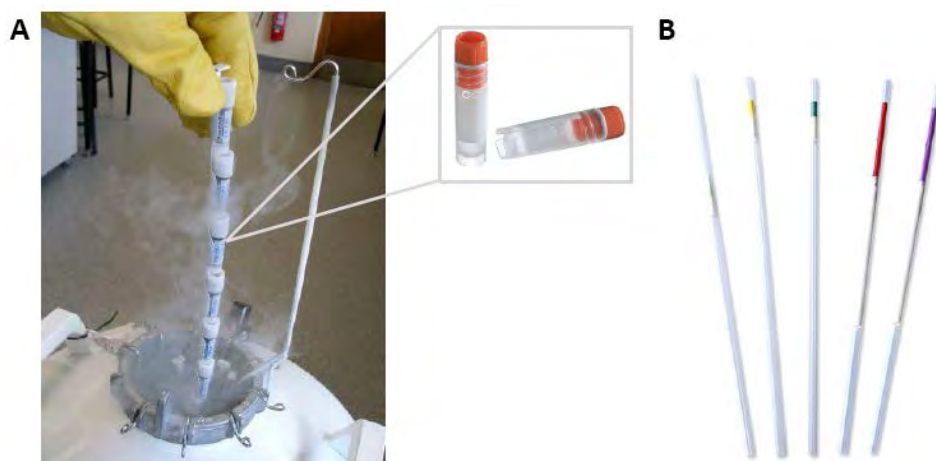
ICSI: Intracytoplasmic sperm injection

³ TESE: Testicular Sperm Extraction

4. Μέθοδοι κατάψυξης και απόψυξης

Όσον αφορά τις μεθόδους κατάψυξης, διακρίνονται σε 2 κατηγορίες, την αργή και τη γρήγορη (ή ταχεία) κατάψυξη. Η τεχνική της αργής κατάψυξης σπερματοζωαρίων προτάθηκε αρχικά από τους Behrman και Sawada (1967) και βασίζεται στην προοδευτική ψύξη των κυττάρων εντός 2- 4 ωρών σε 2 ή 3 βήματα με τη χρήση αυτοματοποιημένου ή μη καταψύκτη. Από την άλλη πλευρά, η γρήγορη κατάψυξη πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνά τα 30 λεπτά, κατά την οποία το δείγμα σπέρματος αρχικά αναμιγνύεται με ίσο όγκο κρυοπροστατευτικού υλικού, φορτώνεται στους περιέκτες και επωάζεται στους 4 °C για 10 λεπτά. Έπειτα, οι περιέκτες τοποθετούνται πάνω από το υγρό άζωτο (-80°C) σε απόσταση περίπου 15cm για 15 λεπτά και βυθίζονται ακολούθως στο υγρό άζωτο. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων κατάψυξης έγκεινται στον χρόνο εκτέλεσης, στο ρυθμό κατάψυξης και στη συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών υλικών. Σχετικά με την απόψυξη, θεωρείται εξίσου σημαντική με την κατάψυξη. Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την απόψυξη μπορεί να παρεκκλίνει μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις η διάρκεια του δεν ξεπερνά τα 15-20 λεπτά. Κατά την απόψυξη, το κύτταρο πρέπει να έχει το χρόνο να ανακτήσει τις φυσιολογικές βιολογικές του λειτουργίες, αποφεύγοντας όσο γίνεται τις απότομες θερμοκρασιακές αλλαγές, που μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη.

Για την κατάψυξη σπερματοζωαρίων χρησιμοποιούνται κρυοφιαλίδια (ή αμπούλες) ή ράβδοι (Εικόνα 1Α, 1Β). Τα κρυοφιαλίδια συνήθως τοποθετούνται σε μεταλλικές ράβδους (ή καλάμια) για την περαιτέρω οργάνωση τους μέσα στο δοχείο με υγρό άζωτο. Ακολούθως, οι μεταλλικές ράβδους βρίσκονται τοποθετημένες μέσα σε κάνιστρα εντός του δοχείου με υγρό άζωτο. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα εργαστήρια πραγματοποιούν την κατάψυξη σπέρματος σε κρυοφιαλίδια με τη γρήγορη μέθοδο. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ότι δίνει σημαντικά ποσοστά επιβίωσης μετά την απόψυξη αλλά παρουσιάζει ως μειονέκτημα τον μη-ομοιόμορφο ρυθμό κατάψυξης τόσο εντός όσο και μεταξύ των κρυοφιαλιδίων του ίδιου δείγματος.



Εικόνα 1: Απεικόνιση των κρυοφιαλιδίων (Α) και των ράβδων (Β). Τα κρυοφιαλίδια είναι τοποθετημένα σε μεταλλικές ράβδους για την περαιτέρω οργάνωση τους μέσα στο δοχείο με υγρό άζωτο.

5. Μηχανισμοί βλάβης των σπερματοζωαρίων από την κατάψυξη

Ένα από τα σημαντικότερα ορόσημα στην ανθρώπινη αναπαραγωγή θεωρείται η κατάψυξη και η επακόλουθη απόψυξη σπέρματος (Bunge and Sherman, 1953). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρονται στους μηχανισμούς βλάβης των σπερματοζωαρίων κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Ο σχηματισμός ενδοκυτταρικού πάγου (κρυστάλλων), το φαινόμενο επίδρασης του διαλύματος (solution effect) και οι αλλαγές της δομής της μεμβράνης (φωσφολιπιδιακή διπλοστιβάδα) θεωρούνται μηχανισμοί- κλειδιά που ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τη βλάβη των σπερματοζωαρίων κατά την κατάψυξη (Mazur 1963, Meryman *et al.* 1977, Farrant 1977, Belous *et al.* 1982).

Αναλυτικότερα, η δημιουργία ενδοκυτταρικού πάγου είναι μια από τις πιο σημαντικές αιτίες της κυτταρικής καταστροφής κατά τη διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης. Για αυτό το λόγο, αρκετοί επιστήμονες εστίασαν την προσοχή τους στη μείωση του ποσότητας των ενδοκυτταρικά σχηματιζόμενων κρυστάλλων. Αυτό επιτεύχθηκε αρχικά μέσω της χρήσης κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων. Το 1949, έγινε για πρώτη φορά αναφορά για τον κρυοπροστατευτικό ρόλο της γλυκερόλης από τους Polge, Smith και Parkers κατά τη διάρκεια της προσπάθειάς τους να διασώσουν τα σπερματοζωάρια από την κατάψυξη. Όσο αφορά τα κρυοπροστατευτικά (CPA), βασικός τους ρόλος είναι η μείωση της αρχικής θερμοκρασίας κατάψυξης ελαχιστοποιώντας με αυτό τον τρόπο τις βλάβες που προκαλούνται από την ευτεκτονική μορφοποίηση. Ο τρόπος με τον οποίο τα κρυοπροστατευτικά ασκούν τη

δράση τους έγκειται στην μετακίνηση μορίων νερού μέσω ώσμωσης και ακολούθως αφυδάτωση του κυττάρου. Ενώ η απομάκρυνση του νερού έξω από το κύτταρο φαίνεται να δίνει τη λύση στη μείωση του σχηματισμού των κρυστάλλων, αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ενός διαφορετικού προβλήματος για το κύτταρο, το ωσμωτικό σοκ (Lovelock 1963, Mazur 1963). Ένα άλλο μειονέκτημα των κρυοπροστατευτικών θεωρείται ο περιορισμός στην ποσότητα που μπορεί να προστεθεί σε ένα διάλυμα, λόγω της τοξικότητας τους (Fahy 1986). Με άλλα λόγια, όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα, τόσο πιο τοξικά γίνονται για τα κύτταρα. Η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα CPA προκαλούν τοξικότητα θα βοηθήσει στην αύξηση των ποσοστών επιτυχίας της κρυοσυντήρησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κρυοπροστατευτικά διακρίνονται στις ακόλουθες 2 κατηγορίες:

- τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά. Πρόκειται για ουσίες μικρού μοριακού βάρους που εμφανίζουν την ικανότητα να διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη (γλυκερόλη και DMSO).
- τα μη- διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά. Είναι ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους οι οποίες δε διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη (γλυκίνη, PVP⁴ και σουκρόζη). Ο τρόπος με τον οποίο ασκούν τη δράση τους έγκεινται στο γεγονός ότι αναστέλλουν την ενδοκυτταρική ανάπτυξη πάγου μέσω της απομάκρυνσης νερού από το κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την αφυδάτωση του κυττάρου.

Στην περίπτωση κρυοσυντήρησης σπέρματος, το πιο γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο κρυοπροστατευτικό είναι η αιθυλενογλυκόλη (EG-ethylene glycol), η οποία ανήκει στην κατηγορία των διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών. Αυτή η ουσία ως κρυοπροστατευτικό ασκεί τις ηπιότερες επιδράσεις στην πλασματική μεμβράνη και στη μεμβρανική διαπερατότητα (Chenier *et al.* 1998, Squires *et al.* 2004, Hess *et al.* 2004).

Ένας άλλος μηχανισμός βλάβης των κυττάρων κατά τη διαδικασία της κατάψυξης αφορά το ρυθμό με τον οποίο πραγματοποιείται η κατάψυξη. Ο Mazur (1963) έδειξε ότι ο ρυθμός κατάψυξης επηρεάζει το σχηματισμό ενδοκυτταρικού πάγου και αντικατοπτρίζεται στο ρυθμό με τον οποίο το νερό διαχέεται διαμέσου της μεμβράνης. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός κατάψυξης ελέγχει το ρυθμό με τον οποίο το

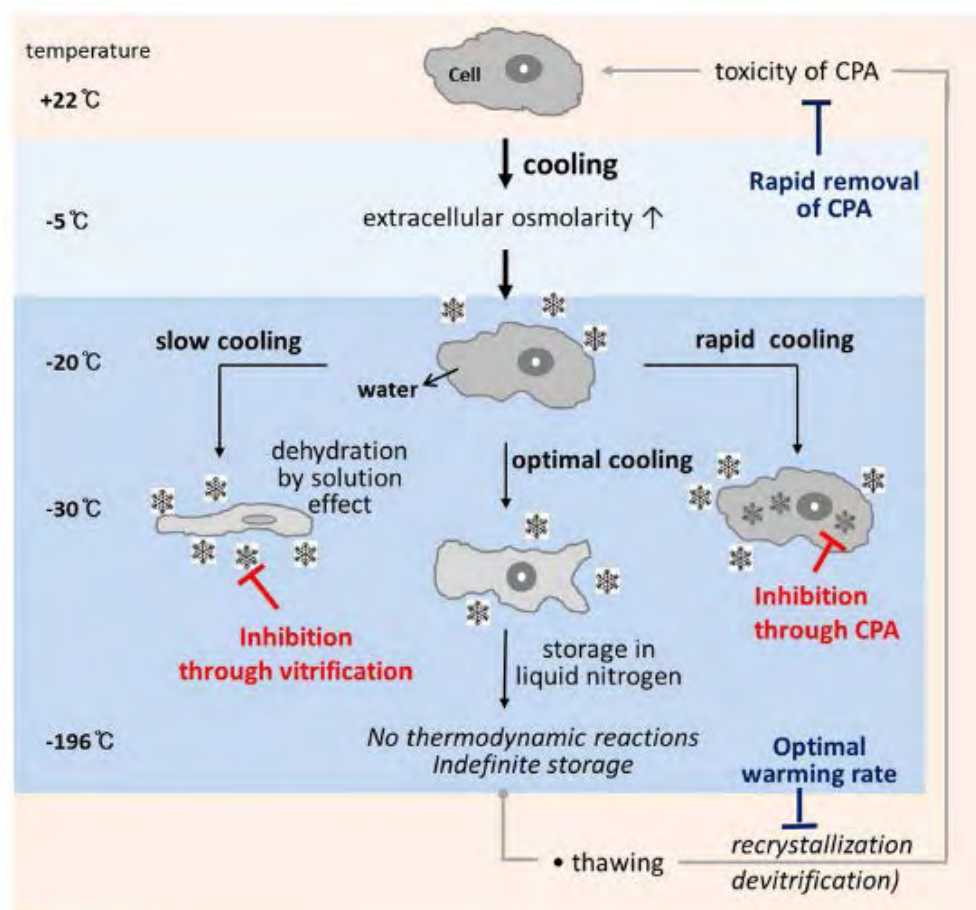
⁴ PVP: Polyvinylpyrrolidone

νερό μετατρέπεται σε πάγο, γεγονός που επιτυγχάνεται από την επίδραση που έχει τόσο στο ρυθμό με τον οποίο η συγκέντρωση των εξωκυτταρικών ουσιών αυξάνει όσο και στον ρυθμό με τον οποίο το νερό φεύγει από το κυτταρόπλασμα. Εάν μεγάλα κύτταρα με σχετικά χαμηλή διαπερατότητα καταψύχονται αργά, είναι πιθανό ότι αυτά τα κύτταρα θα υποστούν αφυδάτωση, η οποία θα αποτρέψει το σχηματισμό ενδοκυτταρικού πάγου. Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση γρήγορης κατάψυξης (ή υαλοποίησης), η δημιουργία ενδοκυτταρικού πάγου αποτρέπεται μέσω της χρήσης υψηλής συγκέντρωσης κρυοπροστατευτικών παραγόντων για μικρά χρονικά διαστήματα (Rall *et al.* 1985). Έτσι, ο ρυθμός κατάψυξης δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ γρήγορος ούτε πολύ αργός καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις αυξάνεται η πιθανότητα σχηματισμού ενδοκυτταρικών κρυστάλλων καθώς και η πιθανότητα εμφάνισης του φαινομένου της επίδρασης του διαλύματος (solution effect). Το φαινόμενο επίδρασης του διαλύματος αφορά την αφυδάτωση που λαμβάνει χώρα στην αργή κατάψυξη, κατά την οποία αυξάνεται η συγκέντρωση των αλάτων εξωκυτταρικά με αποτέλεσμα την κυτταρική συρρίκνωση και καταστροφή. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικά κύτταρα εμφανίζουν διαφορετικούς βέλτιστους ρυθμούς κατάψυξης, οι οποίοι καθορίζονται από τον όγκο, την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (αναλογία του όγκου ως προς την επιφάνεια της μεμβράνης) και από την διαπερατότητα της μεμβράνης για το νερό και τους κρυοπροστατευτικούς παράγοντες (Mazur *et al.* 1985). Στην περίπτωση των σπερματοζωαρίων, ο ιδανικός ρυθμός κατάψυξης έχει υπολογιστεί στους 17°C/min, με βάση τα δεδομένα των Devismita και Kumar (2015).

Όσο αφορά την ευτεκτονική θερμοκρασία, αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό παράγοντα δημιουργίας βλαβών κατά τη διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης. Ο όρος ευτεκτονική θερμοκρασία αναφέρεται στη θερμοκρασία κατά την οποία το σύστημα που υποβάλλεται σε κρυοσυντήρηση βρίσκεται σε θερμοδυναμική ισορροπία και το τμήμα του συστήματος που δεν έχει μετατραπεί σε πάγο μεταπίπτει σε στερεή μορφή μέσω της κρυσταλλοποίησης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλούνται βλάβες κατά την ευτεκτονική μορφοποίηση διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: i) βλάβες στις κυτταροπλασματικές δομές λόγω σχηματισμού ενδοκυτταρικού πάγου (κρυστάλλων) και ii) βλάβες στην πλασματική μεμβράνη που οφείλονται στη δημιουργία κρυστάλλων εξωκυτταρικά.

Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στις τεχνικές κρυοσυντήρησης, είναι ξεκάθαρο ότι η κρυοσυντήρηση εξακολουθεί να προκαλεί εκτεταμένη βλάβη στα

κύτταρα. Εκτός από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, βλάβη μπορεί να προκληθεί και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει με τη σειρά της στη μείωση του μεταβολισμού του κυττάρου καθώς και στη διαταραχή των ενεργειακών του διαδικασιών, μέσω βλάβης στα μιτοχόνδρια (Tchir *et al.* 2010). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε όλη τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης συνοψίζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Απεικόνιση των φυσικών γεγονότων καθώς και των βλαβών που συμβαίνουν στο κύτταρο κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Οι κυτταρικές βλάβες κατά την κρυοσυντήρηση προκαλούνται, τουλάχιστον εν μέρει, λόγω του φαινομένου της επίδρασης του διαλύματος (οδηγώντας το κύτταρο σε ωσμωτικό σοκ) και λόγω του σχηματισμού ενδοκυτταρικού πάγου (οδηγώντας σε καταστροφή των ενδοκυτταρικών δομών) (Jang *et al.* 2017).

6. Επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος και στη γονιμοποιητική του ικανότητα

Τα σπερματοζωάρια αναπτύσσονται διαδοχικά από ανώριμα γεννητικά κύτταρα-σπερματογόνια σε ώριμα σπερματοζωάρια ικανά για γονιμοποίηση. Τα σπερματοζωάρια αποτελούνται από 3 βασικές λειτουργικές περιοχές, την κεφαλή που περιέχει το συμπυκνωμένο γενετικό υλικό, το μέσο τμήμα ή αυχένα που αποτελεί τη πηγή ενέργειας και την ουρά. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων που λαμβάνει χώρα στη επιδιδυμίδα, τα περισσότερα οργάνidia χάνονται μαζί με το κυτταρόπλασμα και πραγματοποιείται συμπίκνωση της χρωματίνης. Η διαδικασία της ωρίμανσης, όμως, έχει ως κόστος για το σπερματοζωάριο τη μείωση της ικανότητας του να επιδιορθώνει τον εαυτό του, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της ευαισθησίας του στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Κατά συνέπεια, ακόμη και υπό ιδανικές συνθήκες, η βλάβη που συμβαίνει στα σπερματοζωάρια κατά τη διαδικασία της κατάψυξης είναι αναπόφευκτη (Andrabi 2007).

6.1 Επίδραση της κρυοσυντήρησης στο μεταβολισμό των σπερματοζωαρίων

Οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη συνδέονται κυρίως με μεταβολές στην παροχή ενέργειας. Αυτό με τη σειρά του φαίνεται να επηρεάζει τόσο το μεταβολισμό του κυττάρου όσο και άλλες λειτουργίες του σπέρματος, όπως την κινητικότητα του (Gillan *et al.* 2004, Dziekonska *et al.* 2009, Cerolini *et al.* 2001). Όπως όλα τα κύτταρα του οργανισμού, και τα σπερματοζωάρια χρειάζονται μια συνεχή παροχή ενέργειας για τη διατήρηση των λειτουργιών τους που είναι αναγκαίες για την επιβίωση και την επίτευξη της αποστολή τους, δηλαδή τη γονιμοποίηση. Επίσης, αφθονία εξωγενών θρεπτικών συστατικών είναι απαραίτητη για τα σπερματοζωάρια, καθώς όταν μεταβολίζονται οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας, με τη μορφή του ATP⁵ (ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου). Κατά την κρυοσυντήρηση παρατηρείται μια σταδιακή μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας των σπερματοζωαρίων, η οποία από τη μία πλευρά μειώνει την παραγωγή επιβλαβών προϊόντων, όπως ελεύθερες ρίζες, αλλά από την άλλη πλευρά επηρεάζει ορισμένες βασικές λειτουργίες τους, όπως την κινητικότητα. Κατά τη διαδικασία κατάψυξης- απόψυξης, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ATP

⁵ ATP: Adenosine triphosphate (τριφωσφορική αδενοσίνη)

μειώνεται δραματικά ενώ ο λόγος AMP/ADP⁶ αυξάνεται. Μεταξύ των διαφόρων μεταβολών της δραστηριότητας των ενδοκυτταρικών ενζύμων, καθοριστικής σημασίας είναι αυτή της 6-φωσφορικής- δεϋδρογονάσης της γλυκόζης (G6PD)⁷, καθώς είναι το πρώτο ένζυμο που απομακρύνεται από το κύτταρο μετά την καταστροφή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης λόγω της κατάψυξης.

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η οποία θεωρείται ότι είναι ένα από τα πιο σημαντικά κριτήρια για την αξιολόγηση του δυναμικού γονιμότητας τους, είναι γνωστό ότι εξαρτάται από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Το ATP παράγεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και στη συνέχεια μεταφέρεται στους μικροσωληνίσκους, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Έτσι, η μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση θεωρείται ότι συνδέεται κατά κύριο λόγο με μιτοχονδριακή βλάβη, λόγω μείωσης των επιπέδων ATP (Ruiz-Pesini *et al.* 2001, Januskauskas *et al.* 2002).

Η κατάψυξη των σπερματοζωαρίων μπορεί, επίσης, να επηρεάσει τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου και αυτό με τη σειρά του κάποιες μεταβολικές διεργασίες. Είναι γνωστό ότι η κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων είναι συνδεδεμένη με το οξειδωτικό stress καθώς και με το φυσικό stress (Mazur *et al.* 2000, Chatterjee *et al.* 2001). Κατά την κρυοσυντήρηση, το οξυγόνο, που είναι αναγκαίο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση, γίνεται αδιάλυτο με αποτέλεσμα η κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου να επιτυγχάνεται μέσω άλλου μεταβολικού μονοπατιού, όπως της γλυκόλυσης. Αυτό σημαίνει ότι τα σπερματοζωάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο οξειδωτικό stress, λόγω της απόλυτης εξάρτησης τους από τον αερόβιο μεταβολισμό. Επιπλέον, η ανικανότητα των σπερματοζωαρίων να συνθέσουν αντιοξειδωτικά σε συνδιασμό τόσο με την ικανότητα τους να παράγουν ανιόντα σουπεροξειδίου (O_2^-)⁸ και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)⁹ όσο και με την απώλεια ενδογενή αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού είναι παράγοντες που συμβάλλουν στο οξειδωτικό stress που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης (Parks *et al.* 1992, Aitken *et al.* 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ενδογενής αντιοξειδωτικός αμυντικός μηχανισμός δεν υπάρχει στα σπερματοζωάρια,

⁶ AMP,ADP: παράγωγα του μεταβολισμού του ATP (AMP: Adenosine monophosphate, ADP: Adenosine diphosphate)

⁷ G6PD: ένζυμο που συμμετέχει στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών

⁸, ⁹ O_2^- , H_2O_2 : πρόκειται για ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια

λόγω της απομάκρυνσης του κυτταροπλάσματος που λαμβάνει χώρα κατά το τελικό στάδιο της σπερμιογένεσης¹⁰. Στα σπερματοζωάρια, η προστασία από τις επιδράσεις των ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , παρέχεται με τη χρήση ποικίλων μορίων εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών (scavengers). Για παράδειγμα, το πυροσταφιλικό οξύ αποτελεί μόριο εξουδετέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη του στο δείγμα σπέρματος σε πειραματόζωα οδηγεί σε σημαντική αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και των επιπέδων ATP (Mohammad *et al.* 2009).

6.2 Επίδραση της κρυοσυντήρησης στη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος

Μόλις τα σπερματοζωάρια φτάσουν στο σημείο της γονιμοποίησης, φαίνεται ότι υπάρχει μια σειρά καλά συντονισμένων μοριακών και κυτταρικών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα πριν τη γονιμοποίηση. Αρχικά, τα σπερματοζωάρια για να αποκτήσουν γονιμοποιητική ικανότητα παραμένουν μερικές ώρες στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποχωρισμένα από το σπερματικό πλάσμα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως ενεργοποίηση και περιλαμβάνει την απομάκρυνση ανασταλτικών ενώσεων του σπερματικού πλάσματος με σκοπό τη σταθεροποίηση της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου προκειμένου η ακροσωμική αντίδραση να μην λάβει χώρα χρονικά νωρίτερα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί λίγο πριν το σπερματοζωάριο πλησιάσει το ωάριο. Μετά την ενεργοποίηση, ακολουθεί μια σειρά γεγονότων που περιλαμβάνουν: τη προσκόλληση του σπερματοζωαρίου στα κοκκώδη κύτταρα της ακτινωτής στεφάνου, την ακροσωμική αντίδραση, τη διέλευση της διαφανής ζώνης, τη σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών ωαρίου- σπερματοζωαρίου, τη συμπλήρωση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης του ωαρίου και τέλος τη συγχώνευση αρσενικού-θηλυκού προπυρήνα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ζygώτη. Κατά τη διαδικασία της ακροσωμικής αντίδρασης, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των ενδοκυτταρικών κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Το 2000, ο Bailey και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η διαδικασία της ενεργοποίησης και η κρυοσυντήρηση επάγουν αρκετές παρόμοιες αλλαγές στο σπέρμα, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου. Όμως, στην περίπτωση της κρυοσυντήρησης, τα σπερματοζωάρια

¹⁰ σπερμιογένεση: διεργασία μετατροπής των ώριμων σπερματίδων σε σπερματοζωάρια

αποτυγχάνουν να μετριάσουν την αύξηση των επιπέδων των ιόντων ασβεστίου. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι δομικές αλλαγές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που συμβαίνουν κατά την κρυοσυντήρηση θεωρείται ότι ευνοούν περαιτέρω την αύξηση των επιπέδων του Ca^{2+} . Έτσι, οι μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} επάγουν διαταραχές τόσο της ενεργοποίησης του σπερματοζωαρίου όσο και της ακροσωμικής αντίδρασης, γεγονός που επηρεάζει με τη σειρά του τη δυναμική γονιμοποίησης του σπερματοζωαρίου μετά την κατάψυξη. Επιπλέον, η κρυοσυντήρηση δημιουργεί έναν υποπληθυσμό σπερματοζωαρίων τα οποία είναι νεκρά και μερικώς ή πλήρως ενεργοποιημένα, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την ετερογένεια στο σπέρμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι μερικά σπερματοζωάρια μετά την κρυοσυντήρηση φαίνεται να είναι μερικώς ενεργοποιημένα, γεγονός που βασίζεται στις δομικές αλλαγές της μεμβράνης που συμβαίνουν με την απόψυξη (Bailey *et al.* 2000).

Η ενεργοποίηση που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που σχετίζονται με τη μειωμένη μακροζωία και την μικρή επιβίωση των σπερματοζωαρίων μέσα στην γυναικεία αναπαραγωγική οδό (Bailey *et al.* 2000, Watson 2000). Επιπλέον, οι δομικές αλλαγές της μεμβράνης στη κεφαλή του σπερματοζωαρίου μετά την κρυοσυντήρηση φαίνεται να διαταράσσουν την ικανότητα του να αλληλεπιδράσει με τα κύτταρα της γυναικείας γεννητικής οδού (Lessard *et al.* 2000, Watson 2000).

6.3 Γονιμότητα και ποσοστά κύησης κατεψυγμένου σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που παρέχει νέες ευκαιρίες στην αναπαραγωγή του ανθρώπου και των ζώων. Βέβαια, ακόμη και με τις καλύτερες τεχνικές μέχρι σήμερα, η διαδικασία της κρυοσυντήρησης εξακολουθεί να προκαλεί βλάβες στα σπερματοζωάρια. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η κρυοσυντήρηση επηρεάζει τη γονιμότητα μέσω της επίδρασης που ασκεί στη μεμβράνη, στην κινητικότητα και στο μεταβολισμό των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, η κατάψυξη και η επακόλουθη απόψυξη καθιστούν τα σπερματοζωάρια, που επιβιώνουν από τη διαδικασία, μορφολογικά διαφορετικά από εκείνα πριν τη κρυοσυντήρηση. Έτσι, τα σπερματοζωάρια γίνονται πολύ πιο ευαίσθητα σε κάθε μορφή stress τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Όσον αφορά τα ποσοστά κύησης, δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ του φρέσκου και κατεψυγμένου σπέρματος. Παρόλο που η διαδικασία κρυοσυντήρησης σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό βλάβης στο DNA των σπερματοζωαρίων, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα σύλληψης και κύησης δεν επηρεάζονται, αλλά η διαφορά εντοπίζεται κυρίως στην αύξηση της συχνότητας των αυτόματων αποβολών. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι είναι πολύ δύσκολο να προβλέψουμε με συνάφεια τα πιθανά ποσοστά κύησης καθώς και να συγκρίνουμε με ακρίβεια τα ποσοστά κύησης που έχουν ληφθεί από διαφορετικές ερευνητικές εργασίες κάνοντας χρήση του κατεψυγμένου σπέρματος. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι στην πλειονότητα των εργασιών που διεξάγονται υπάρχουν πολλές διαφορετικές μεταβλητές, οι οποίες συνήθως δεν προσδιορίζονται λεπτομερώς. Ενδεικτικά κάποιες μεταβλητές, από τις οποίες επηρεάζονται τα ποσοστά κύησης, είναι το ζώο, που χρησιμοποιείται στην έρευνα, και η ποιότητα του παραγόμενου σπέρματος, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που τοποθετείται σε κάθε κρυοφυαλίδιο, το πρωτόκολλο κατάψυξης, το πρωτόκολλο απόψυξης, ο έλεγχος του σπέρματος μετά την απόψυξη καθώς και ο αριθμός και η αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών που χρησιμοποιούνται. Τέλος, η γονιμότητα ενός αρσενικού είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτημένη από τη γονιμότητα του θηλυκού και για αυτό καλό θα ήταν να μην αξιολογείται ανεξάρτητα από εκείνη του θηλυκού (Amann 2005).

7. Επίδραση της κρυοσυντήρησης στην ακεραιότητα του DNA του σπέρματος

Η δομή του DNA είναι πλέον γνωστή καθώς έχει περιγραφεί λεπτομερώς εδώ και αρκετά χρόνια από τους Watson και Crick (1953). Ενώ το DNA είναι ένα εξαιρετικά σταθερό μακρομόριο, η πρωτογενής δομή του βρέθηκε ότι είναι αρκετά δυναμική και υπόκειται σε συνεχείς αλλαγές (Friedberg 1995). Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μεταθέσεις γονιδίων ή αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (κυρίως μέσω μεταλλαξιγένεσης) και προκύπτουν συνήθως ως αποτέλεσμα λαθών που γίνονται κατά την αντιγραφή ή επιδιόρθωση του γενετικού υλικού (Finnegan 1990).

Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί μέχρι σήμερα στον τομέα της αναπαραγωγής, οι ανησυχίες σχετικά με την κρυοσυντήρηση έχουν την τάση να επικεντρώνονται κυρίως στην επιβίωση και στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την κατάψυξη- απόψυξη. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με την ακεραιότητα του γενωμικού DNA των κυττάρων μετά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Υπάρχουν

ενδείξεις οι οποίες υποστηρίζουν ότι η κρυοσυντήρηση δεν σταματάει αποτελεσματικά το χρόνο με την έννοια ότι κάποια κύτταρα φαίνεται να δέχονται την επίδραση του χρόνου (Honda *et al.* 2001).

Η κρυοσυντήρηση προκαλεί αλλαγές στην ωσμωτική πίεση, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή αύξηση της συχνότητας της ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ των αδερφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange-SCE) (Galloway *et al.* 1987). Με αυτό τον τρόπο, το υπερωσμωτικό stress μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA ή να αναστείλει την επιδιόρθωσή του οδηγώντας σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Kultz *et al.* 2001). Ο Kultz και οι συνεργάτες του, 2001, πρότειναν τρεις μηχανισμούς με τους οποίους το ωσμωτικό stress μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συχνότητας των δίκλωνων θραύσεων του DNA (dsb- double-strand breaks):

1. Η κυτταρική συρρίκνωση που λαμβάνει χώρα κατά την κατάψυξη αυξάνει την ιοντική ισχύ και την παραμόρφωση του καλουπιού- μήτρας του DNA, γεγονός που οδηγεί σε αλλαγές στη δυσκαμψία του DNA. Αυτό θα μπορούσε να μεταφραστεί σε αύξηση της μηχανικής πίεσης στο μόριο του DNA σε περιοχές, όπου η συσκευασία της χρωματίνης είναι πολύ άκαμπτη, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε αύξηση της πιθανότητας θραύσης του DNA σ' αυτές τις περιοχές.
2. Το υπερωσμωτικό stress μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία δίκλωνων θραύσεων του DNA μέσω του σχηματισμού ελεύθερων ριζών (McCarthy *et al.* 2010). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια του υπερωσμωτικού stress παρατηρείται ενεργοποίηση ενζύμων που αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, όπως είναι η καταλάση¹¹ (Kalweit *et al.* 1990).
3. Τα δίκλωνα θραύσματα στο DNA θα μπορούσαν να προκύψουν από μεταβολές στο πόσο συμπαγής είναι η χρωματίνη καθώς και από μεταβολές στην προσβασιμότητα του DNA από παράγοντες κατά τη διάρκεια του ωσμωτικού stress. Αυτές οι αλλαγές διαταράσσουν την ισορροπία ανάμεσα στην επιδιόρθωση του DNA και στην πρόκληση βλαβών σε αυτό. Επίσης,

¹¹ Καταλάση: ένζυμο αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών, το οποίο καταλύει την αντίδραση
 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

μπορεί να οδηγήσουν στην ενίσχυση της πρόσβασης των νουκλεασών¹² για συγκεκριμένες περιοχές του DNA.

Εκτός από τη δομή του DNA, έχει αποδειχθεί ότι οι ιστόνες¹³ καθώς και οι πρωταμίνες¹⁴ μπορούν, επίσης, να υποστούν δομικές και λειτουργικές αλλαγές κατά τη διαδικασία κατάψυξης- απόψυξης. Η χαμηλή θερμοκρασία και η διακύμανση του pH είναι παράγοντες που αλλοιώνουν τη δομή των πρωτεϊνών (Privalov 1990).

7.1 Μέθοδοι αξιολόγησης της ακεραιότητας του DNA

Η επίδραση της κρυοσυντήρησης στην ακεραιότητα του DNA είναι ένα ζήτημα αμφιλεγόμενο. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση (Kalthur *et al.* 2008, Zribi *et al.* 2010, Meamar *et al.* 2012) ενώ άλλες θεωρούν ότι δεν υπάρχει καμία επίδραση της κρυοσυντήρησης στην ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων (Duru *et al.* 2001, Kadirvel *et al.* 2009, Vutyavanich *et al.* 2010). Η διαφορά των αποτελεσμάτων μπορεί να εξηγηθεί από τη διαφορά στη μέθοδο κρυοσυντήρησης ή τη διαφορά στις μεθόδους αξιολόγησης του DNA μετά την κρυοσυντήρηση.

Μια ποικιλία μεθόδων χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ακεραιότητας του DNA μετά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, η οποία περιλαμβάνει τις δοκιμές TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling), Oxy DNA, COMET, τη δοκιμή AO (Acridine orange), SCD (Sperm chromatin dispersion test-δοκιμή διασποράς της χρωματίνης) καθώς και τη SCSA (Sperm chromatin structure assay).

Αναλυτικότερα, η δοκιμή TUNEL μετράει τόσο τις μονόκλωνες όσο και τις δίκλωνες θραύσεις του DNA με τη βοήθεια ελεύθερων ομάδων 3- υδροξυλίου και μ' αυτό τον τρόπο παρέχει ουσιαστικές πληροφορίες σχετικά με το δυναμικό εμφύτευσης του εμβρύου (Zini *et al.* 2008, 2009). Η δοκιμή αυτή είναι τεχνικά λιγότερο απαιτητική, σε σύγκριση με τη δοκιμή SCSA, και δεν έχει βελτιστοποιηθεί για χρήση με ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Η κανονικοποίηση της μεθόδου κρίνεται αναγκαία καθώς μέχρι σήμερα λίγα εργαστήρια έχουν επιδιώξει να χρησιμοποιήσουν τη συγκεκριμένη δοκιμή σε κλινικό περιβάλλον (Sharma *et al.* 2010).

¹² Νουκλεάσες: ένζυμα τα οποία αποικοδομούν (κόβουν) νουκλεϊκά οξέα.

¹³ Ιστόνες: πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο πακετάρισμα του DNA σε νουκλεοσώματα

¹⁴ Πρωταμίνες: βρίσκονται στο DNA των σπερματοζωαρίων και δημιουργούν ισχυρότερες συνδέσεις με το DNA από ότι οι ιστόνες.

Η δοκιμή COMET ή single-cell gel electrophoresis (SCGE- ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα από ένα μόνο κύτταρο) είναι μια σχετικά απλή και ευαίσθητη μέθοδος για τη μέτρηση θραύσεων στο DNA των σπερματοζωαρίων (Ostling *et al.* 1984). Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα σπερματοζωάρια ενσωματώνονται σε ένα λεπτό στρώμα αγαρόζης και ακολουθεί λύση σε υψηλές συνθήκες άλατος. Με αυτό τον τρόπο, απομακρύνονται οι πρωταμίνες και οι ιστόνες επιτρέποντας στον πυρήνα να σχηματίσει μια δομή- νουκλεόσωμα που αποτελείται από θηλιές DNA. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση, κατά την οποία οι κομμένες αλυσίδες DNA μεταναστεύουν προς την άνοδο με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ουράς Comet που προεξέχει από το νουκλεόσωμα. Η δοκιμή COMET διακρίνεται σε 2 κατηγορίες, i) την ουδέτερη και ii) την αλκαλική Comet. Η διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών, όπως υποδηλώνουν και τα ονόματά τους, αφορά το pH, στο οποίο μεταναστεύουν οι θραύσεις του DNA (ουδέτερο και αλκαλικό). Επιπλέον, το ουδέτερο Comet ανιχνεύει δίκλωνες θραύσεις του DNA (DSB) (Olive *et al.* 1991), ενώ το αλκαλικό Comet ανιχνεύει και μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις (Singh *et al.* 1988).

Όσο αφορά τη δοκιμασία AO, μετράει την ικανότητα του πυρηνικού DNA των σπερματοζωαρίων παρουσία οξέος, οδηγώντας σε μετατόπιση του φθορισμού από πράσινο (φυσικό ή αλλιώς μη μετουσιωμένο DNA) σε κόκκινο (μετουσιωμένο DNA). Η χρωστική AO συνδέεται σε μονόκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα να παρεμβάλλεται στο δίκλωνο DNA με τη μορφή μονομερούς (Hoshi *et al.* 1996).

Το SCSA είναι ένα τεστ κυτταρομετρίας ροής όπου οι θραύσεις του DNA των σπερματοζωαρίων μπορούν να εκτιμηθούν έμμεσα μέσω της μετουσίωσης του DNA. Η δοκιμασία αυτή μετράει την ευαισθησία του DNA στη μετουσίωση που προκαλείται από οξύ, ακολουθούμενη από χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική acridine orange. Μέχρι σήμερα, αποτελεί τη μόνη μέθοδο που χρησιμοποιείται κλινικά με αξιοπιστία για την αξιολόγηση του δυναμικού γονιμότητας των αρσενικών (Evenson *et al.* 1980, Evenson *et al.* 2002, Spano *et al.* 2000).

Η δοκιμή SCD παράγει μια δομή που περιλαμβάνει το πυρήνα του σπερματοζωαρίου και ένα περιφερικό φωτοστέφανο, το οποίο σχηματίζεται λόγω της απελευθέρωσης βρόχων του DNA. Η παρουσία του φωτοστεφάνου υποδηλώνει την απουσία κατακερματισμού του DNA (Fernández *et al.* 2002). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανάλυση του κατακερματισμού του DNA και της ανευπλοειδίας (Fernández *et al.* 2005) και σχετικά πρόσφατα έχει βελτιωθεί με την προώθηση του Halosperm kit (Muriel *et al.* 2007). Η μελέτη του Fernández και των

συναδέλφων του, 2005, έφερε στο φως τις διαφορές στα επίπεδα κατακερματισμού του DNA μεταξύ της δοκιμής SCD και SCSA (Evenson *et al.* 2005).

Σύμφωνα με τη χρώση του ανθρώπινου σπέρματος με acridine orange, έχει δειχθεί ότι το επίπεδο του φυσικού DNA μειώνεται σημαντικά μετά την κρυοσυντήρηση (Royere *et al.* 1991, Chohan *et al.* 2004). Ωστόσο, ακόμα και πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία σπέρματος, το ποσοστό του φυσικού DNA εμφανίζει διακυμάνσεις μεταξύ των ατόμων (Hoshi *et al.* 1996). Έτσι, η επιτυχία της κρυοσυντήρησης εξαρτάται τόσο από την αρχική ποιότητα των κυττάρων καθώς και από το γεγονός ότι σπερματοζωάρια χαμηλής ποιότητας είναι πιθανό να είναι λιγότερο ανθεκτικά στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης (Hammadeh *et al.* 1999, Kalthur *et al.* 2008; Kopeika *et al.* 2008). Επιπλέον, η παρουσία μονόκλωνων θραύσεων του DNA (όπως αξιολογείται με το αλκαλικό Comet) είναι σημαντικά υψηλότερη σε δείγματα υπογόνιμων ανδρών μετά την κρυοσυντήρηση σε σύγκριση με εκείνα γόνιμων δοτών (Donnelly *et al.* 2001, Hammadeh *et al.* 1999).

Συνοψίζοντας, η μέτρηση του κατακερματισμού του DNA (DNA fragmentation) είναι ένα σημαντικός βιοδείκτης της ανδρικής υπογονιμότητας. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ακεραιότητας του DNA. Κάποιες από αυτές τις δοκιμές μετρούν τη βλάβη του DNA άμεσα (TUNEL) ενώ άλλες μετρούν τη βλάβη μετά από μετουσίωση του DNA σε όξινο ή αλκαλικό pH (COMET, SCD). Κάποιες δοκιμές βασίζονται στα φάσματα εκπομπής των χρωστικών με τη χρήση μικροσκοπίου. Να σημειωθεί ότι η δοκιμή TUNEL και SCSA θεωρούνται οι καλύτερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των βλαβών του DNA του σπέρματος σε κλινικό επίπεδο (Evenson *et al.* 1999, Sakkas *et al.* 2010, Bungum *et al.* 2011).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δεκαπέντε (15) δείγματα σπέρματος τα οποία λήφθηκαν από άντρες οι οποίοι είτε συμμετείχαν εθελοντικά στη διεξαγωγή της κλινικής αυτής μελέτης, είτε υποβλήθηκαν σε ανάλυση σπέρματος-σπερμοδιάγραμμα για λόγους γονιμότητας. Τα δείγματα λήφθηκαν μόνο κατόπιν έγγραφης συναίνεσης από όλους τους συμμετέχοντες. Πριν την ανάλυση σπέρματος, οι συμμετέχοντες κατέγραφαν σε ένα έγγραφο την ηλικία, το βάρος, το ύψος τους καθώς και τις συνήθειες τους για το κάπνισμα και το αλκοόλ.

2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν μετά από 2 έως 5 ημέρες αποχής από σεξουαλικές επαφές σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία συλλογής σπέρματος και ακολούθησε ρευστοποίηση του εκάστοτε δείγματος για τουλάχιστον 20 λεπτά στους 37°C. Μετά τη ρευστοποίηση, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του δείγματος σπέρματος, η οποία περιλάμβανε τον καθορισμό του όγκου του, της συγκέντρωσης και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, 2010). Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εκφράζεται με τη μορφή ποσοστού σύμφωνα με την ακόλουθη κατάταξη: σπερματοζωάρια που επιτελούν ταχεία προωθητική κίνηση (a), βραδεία προωθητική κίνηση (b), επιτόπια κίνηση (c) και ακινησία (d). Όσον αφορά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων, πραγματοποιήθηκε με την εναπόθεση μιας σταγόνας ρευστοποιημένου δείγματος σπέρματος (10 μ l) στο κέντρο της αντικειμενοφόρου Makler και επακόλουθη καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (WANG BioMedical) με 25x μεγέθυνση.

Μετά τον υπολογισμό των προαναφερθέντων παραγόντων, χρησιμοποιήθηκε ένα ποσό του δείγματος (25 μ l) για τη μέτρηση του κατακερματισμού του DNA, όπως περιγράφεται ακολούθως. Ένα άλλο μέρος του αρχικού δείγματος σπέρματος (~250 μ l) προετοιμαζόταν για κατάψυξη με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης στην κινητικότητα και στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων. Η μέθοδος κατάψυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ταχεία,

σύμφωνα με την οποία κάθε δείγμα τοποθετήθηκε αρχικά σε κρυοφιαλίδιο και ακολούθως αναμιγνυόταν με ίσο όγκο κρυοπροστατευτικού υλικού (COOK medical), του οποίου η προσθήκη στο δείγμα πραγματοποιήθηκε αργά με τη μορφή σταγόνων. Ακολούθησε επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το κρυοφιαλίδιο τοποθετήθηκε σε μεταλλική ράβδο και στη συνέχεια βυθιζόταν στο υγρό άζωτο (-196°C).

Για την εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης στις παραμέτρους του σπέρματος, το κάθε δείγμα αποψύχθηκε μέσω της εναπόθεσης του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10-15 λεπτά. Μετά την απόψυξη, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της κινητικότητας και του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων με τις αναφερθείσες διαδικασίες.

3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA

Η αξιολόγηση του κατακερματισμού του DNA στο σπέρμα πραγματοποιείται με τη χρήση του Halosperm[®] G2 kit, όπως έχει αναλυτικά περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Anifandis *et al.* 2014, Anifandis *et al.* 2017, Anifandis *et al.* 2018, Bounartzi *et al.* 2016). Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια μέθοδο διασποράς της χρωματίνης του σπέρματος (SCD- Sperm Chromatin Dispersion). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρουσία ή απουσία της χρωστικής halo μετά από ειδική επεξεργασία. Όσο αφορά το πρωτόκολλο της μεθόδου, erppendorf, το οποίο περιείχε 50μl αγαρόζης, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους $95-100^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά με στόχο να λιώσει η αγαρόζη. Ακολούθως, διατηρήθηκε σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 37°C για την επίτευξη της σταθεροποίησης της θερμοκρασίας πριν την εναπόθεση του δείγματος.

Παράλληλα, ένα τμήμα του δείγματος σπέρματος (~25μl) τοποθετήθηκε σε erppendorf και ακολούθησε διάλυση του δείγματος σε προθερμασμένο καλλιεργητικό υλικό με στόχο η μέγιστη τελική συγκέντρωση του μίγματος να είναι 20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ml. Να σημειωθεί ότι σε περίπτωση που το δείγμα του σπέρματος είχε συγκέντρωση κάτω από 20 εκατομμύρια/ml, χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω διάλυση. Μετά το πέρας των 5 λεπτών επώασης στους 37°C , μεταφέρθηκαν 25μl του αραιωμένου ή μη δείγματος σπέρματος στο erppendorf με την αγαρόζη και πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας. Μία σταγόνα (8μl) του δείγματος με την αγαρόζη μεταφέρθηκε άμεσα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων κατά την

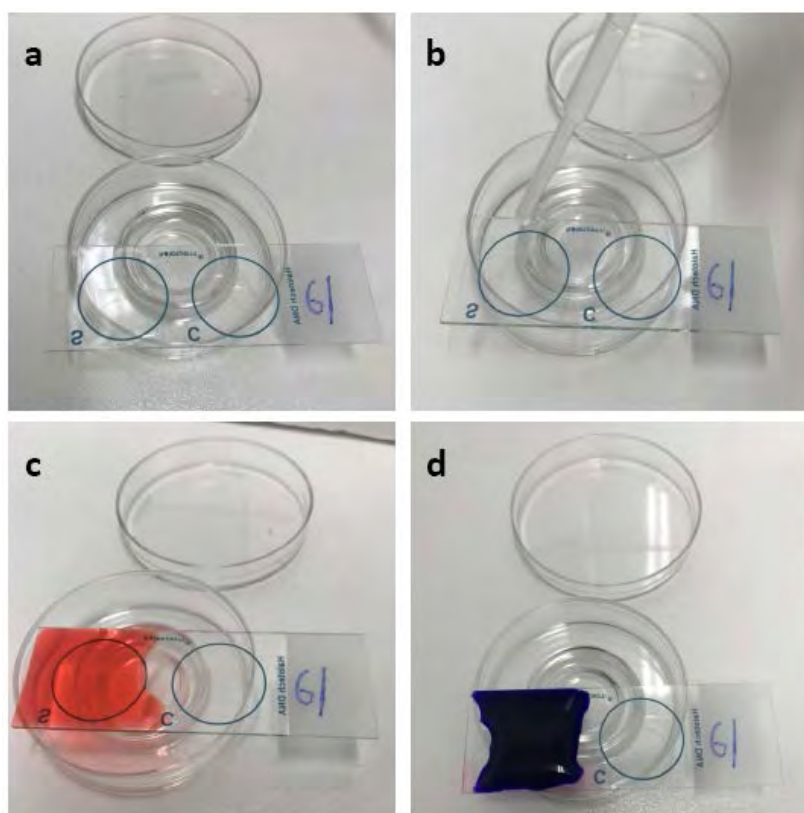
εναπόθεση της. Η αντικειμενοφόρος πλάκα μεταφέρθηκε στο ψυγείο (4 °C) πάνω σε μια κρύα μεταλλική επιφάνεια για 5 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί η αγαρόζη. Μετά το πέρας των 5 λεπτών στο ψυγείο, ακολούθησε απομάκρυνση της καλυπτρίδας και η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε οριζόντια και πιο ανυψωμένη θέση με τη βοήθεια ενός τρυβλίου. Αρχικά, προστέθηκε ο αποδιατακτικός παράγοντας (διάλυμα 1) με τέτοιο τρόπο ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια και μετά από 5 λεπτά επώασης απομακρύνθηκε (Εικόνα 3a). Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος πλύσης (διάλυμα 2) και επώαση για 20 λεπτά. Μετά την πλύση με άφθονο απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (70% και 100%) για 2 λεπτά στη κάθε συγκέντρωση με τη χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur, με στόχο την αφυδάτωση της αντικειμενοφόρου πλάκας (Εικόνα 3b). Η αντικειμενοφόρος πλάκα στέγνωσε από την αιθανόλη μετά από έκθεση σε αέρα και προστέθηκαν διαδοχικά δύο διαλύματα (διάλυμα 3 και 4, για 7 λεπτά αντίστοιχα), τα οποία προσδίδουν έντονη χρώση στην περιφέρεια της κεφαλής των σπερματοζωαρίων με τη μορφή φωτοστέφανου (Εικόνα 3c, 3d). Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή η παρατήρηση των σπερματοζωαρίων στο οπτικό μικροσκόπιο και η κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με την παρουσία ή απουσία της χρωστικής.

Σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρία, υπάρχει η ακόλουθη κατηγοριοποίηση των σπερματοζωαρίων ανάλογα με την ύπαρξη της χρωστικής:

- Σπερματοζωάρια με παρουσία φωτοστέφανου από μέτριο έως μεγάλο μέγεθος θεωρούνται ότι δεν παρουσιάζουν κατακερματισμό στο DNA τους,
- Σπερματοζωάρια με παρουσία φωτοστέφανου σε μικρό μέγεθος θεωρούνται ότι παρουσιάζουν κατακερματισμό στο DNA τους,
- Σπερματοζωάρια με απουσία φωτοστέφανου ή με παρουσία εκφυλισμού θεωρούνται επίσης ότι παρουσιάζουν κατακερματισμό στο DNA τους.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού κατακερματισμού του DNA του σπέρματος (SDF- Sperm DNA Fragmentation Index) χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $SDF(\%) = (\text{σπερματοζωάρια με κατακερματισμό} + \text{εκφυλισμένα σπερματοζωάρια}) / \text{συνολικό αριθμό μετρημένων σπερματοζωαρίων}$. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μέτρηση 300 σπερματοζωαρίων σε κάθε δείγμα σπέρματος με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και μεγέθυνση 40x. Τουλάχιστον δύο διαφορετικές μετρήσεις των 150

σπερματοζωαρίων έγιναν σε κάθε δείγμα, προκειμένου να αποφευχθεί κάποιο σφάλμα.



Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτική εικόνα αντικειμενοφόρου πλάκας που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της κατάψυξης στην κινητικότητα και στον κατακερματισμό του DNA. Το κεντρικό τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε προκειμένου η αντικειμενοφόρος πλάκα να βρίσκεται σε οριζόντια και πιο ανυψωμένη θέση σε σύγκριση με τον πάγκο εργασίας. Αρχικά, απεικονίζεται η προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα (διάλυμα 1) με τέτοιο τρόπο ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια (a), έπειτα η προσθήκη 70% αιθανόλης με τη χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur (b) και τέλος η προσθήκη διαλυμάτων 3 και 4, τα οποία προσδίδουν έντονη χρώση στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων με τη μορφή φωτοστέφανου (c και d αντίστοιχα). Η προσθήκη των διαλυμάτων που προαναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκε στην αριστερή πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας. Να σημειωθεί ότι στην ίδια αντικειμενοφόρο πλάκα μπορεί να γίνει επεξεργασία δύο δειγμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά δεδομένα και οι βασικοί παράμετροι του σπέρματος πριν την κατάψυξη των δειγμάτων απεικονίζονται στον Πίνακα 1. Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων του σπέρματος, όσο αφορά την κινητικότητα και τα ποικίλα ποσοστά κατακερματισμού του DNA (μικρό φωτοστέφανο, απουσία φωτοστεφάνου και εκφυλισμένα σπερματοζωάρια), πριν και μετά την κατάψυξη. Αρχικά, η κρυοσυντήρηση είχε σημαντική επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση στην προωθητική κίνηση των σπερματοζωαρίων, κινητικότητα a και b, μετά την απόψυξη ($56,8\% \pm 2,6$ vs $28,7 \pm 3,1$) ($p < 0,05$). Μετά την κατάψυξη και απόψυξη, το ποσοστό των ακίνητων σπερματοζωαρίων αυξήθηκε σημαντικά από 27,1% σε 54,6% ($p < 0,05$). Στην περίπτωση της μη- προωθητικής κίνησης (ομάδα c), δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση μετά την απόψυξη των δειγμάτων σπέρματος.

Όσο αφορά το κατακερματισμό του DNA του σπέρματος, η κρυοσυντήρηση φαίνεται να οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού SDF (Sperm DNA Fragmentation) ($34,3\% \pm 1,1$ vs $48,6\% \pm 1,1$) ($p < 0,05$) (Γράφημα 1). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με μικρό φωτοστέφανο γύρω από τη περιφέρεια τους μειώθηκε σημαντικά μετά την απόψυξη σε σύγκριση με πριν την κατάψυξη ($44,7\% \pm 3,1$ vs $58,6\% \pm 5,8$) ($p < 0,05$). Αντίθετα, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων χωρίς φωτοστέφανο αυξήθηκε σημαντικά από 44,1% σε 62,4% μετά την απόψυξη ($p < 0,05$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού εκφυλισμού των σπερματοζωαρίων μετά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης ($45,2\% \pm 7,5$ vs $25,1\% \pm 1,1$ $p < 0,05$).

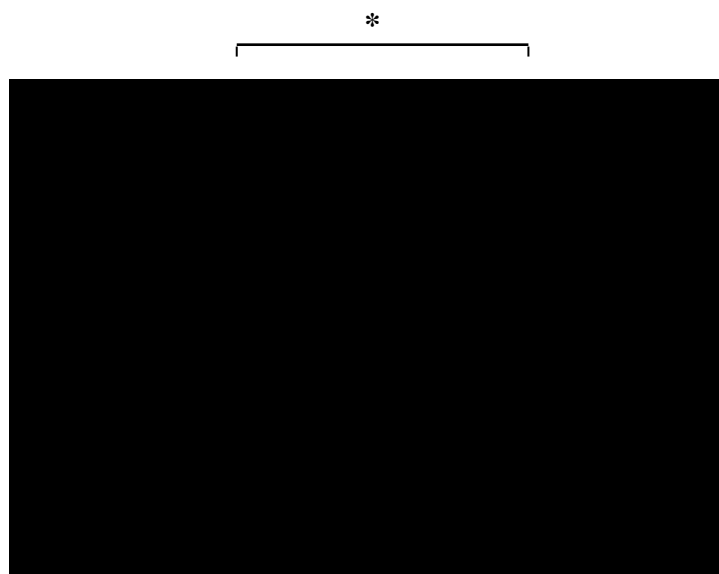
Η συσχέτιση μεταξύ της κινητικότητας και του ποσοστού SDF φαίνεται στο Γράφημα 2.

Μεταβλητές	Μέσος όρος \pm SE
Αριθμός δειγμάτων	15
Ηλικία (χρόνια)	40,4 \pm 1,6
BMI (Kg/ m ²)	27,5 \pm 0,6
Όγκος (mL)	2,7 \pm 0,3
Συγκέντρωση (mil/ mL)	46,5 \pm 7,8
PRM (%)	56,8 \pm 2,6
NPM (%)	16,2 \pm 1,3
IM (%)	27,1 \pm 2,7

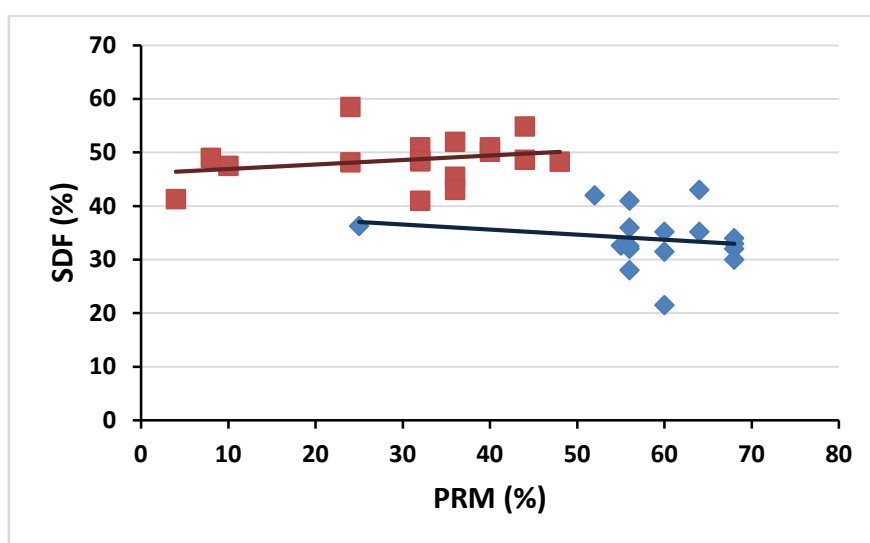
Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά των ανδρών (n=15) και βασικοί παράμετροι του σπέρματος πριν την κατάψυξη των δειγμάτων. SE: Standard Error (Τυπικό σφάλμα), BMI: Body Mass Index (δείκτης μάζας σώματος), mil/ mL: εκατομμύρια/ mL, PRM: progressive motility (προωθητική κίνηση), NPM: non- progressive motility (μη προωθητική κίνηση), IM: immotility (ακίνητα).

Μεταβλητές	Πριν την κατάψυξη	Μετά την απόψυξη	P value
Αριθμός δειγμάτων	15	15	
PRM (%)	56,8 \pm 2,6	28,7 \pm 3,1	<0,05
NPM (%)	16,2 \pm 1,3	16,6 \pm 1,9	NS
IM (%)	27,1 \pm 2,7	54,6 \pm 4,5	<0,05
SDF (%)	34,3 \pm 1,1	48,6 \pm 1,1	<0,05
small halo	44,7 \pm 3,1	58,6 \pm 5,8	<0,05
no halo	44,1 \pm 4,8	62,4 \pm 4,2	<0,05
degenerative	45,2 \pm 7,5	25,1 \pm 1,1	<0,05

Πίνακας 2: Απεικόνιση των τιμών των παραμέτρων του σπέρματος με τη μορφή Μέσου όρου \pm SE (Standard Error: τυπικό σφάλμα) πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη των δειγμάτων. PRM: progressive motility (προωθητική κίνηση), NPM: non- progressive motility (μη προωθητική κίνηση), IM: immotility (ακίνητα), SDF: Sperm DNA fragmentation, small halo: μικρό φωτοστέφανο γύρω από τη περιφέρεια του σπερματοζωαρίου, no halo: καθόλου φωτοστέφανο, degenerative: εκφυλισμένα σπερματοζωάρια.



Γράφημα 1: Απεικόνιση των μέσων όρων του ποσοστού κατακερματισμού του DNA πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη των δειγμάτων. Η κρυοσυντήρηση φαίνεται να οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού της κατάτμησης του γενετικού υλικού (34,3% vs 48,6%) ($p < 0,05$). Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$). SDF: Sperm DNA fragmentation.



Γράφημα 2: Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ του ποσοστού κατακερματισμού του DNA και της προωθητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη των δειγμάτων. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα πριν την κατάψυξη και με κόκκινο χρώμα τα δείγματα μετά την απόψυξη. SDF: Sperm DNA fragmentation, PRM: progressive motility.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπάρχουν ποικίλλα χαρακτηριστικά ενός σπερματοζωαρίου που είναι απαραίτητα για τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου και τα οποία πρέπει να διατηρηθούν μετά την κρυοσυντήρησή του. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι η ακεραιότητα του DNA και η κινητικότητα. Σε αυτή τη μελέτη, οι προαναφερθέντες παράμετροι του σπέρματος αξιολογήθηκαν σε δεκαπέντε δείγματα σπέρματος, τόσο πριν την κατάψυξη όσο και μετά την απόψυξη με στόχο τη μελέτη των επιδράσεων της κρυοσυντήρησης σε αυτές.

Είναι γνωστό ότι η χρωματίνη του σπερματοζωαρίου είναι καλά οργανωμένη και έχει υψηλό βαθμό συμύκνωσης (Smit *et al.* 2010). Στη σπερματογένεση, οποιαδήποτε τροποποίηση, η οποία συμβαίνει στη χρωματίνη του σπερματοζωαρίου, μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στις λειτουργίες του σπέρματος (Didolkar *et al.* 1980). Έχει αποδειχθεί από αρκετές μελέτες ότι ο κατακερματισμός του DNA συσχετίζεται με την ποιότητα του σπέρματος (Sergeie *et al.* 2005, Evgeni *et al.* 2015, Montjean *et al.* 2015, Peluso *et al.* 2013). Σε αυτή την ερευνητική εργασία, παρατηρήθηκε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού SDF και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων τόσο πριν όσο και μετά την κατάψυξη, η οποία είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Lin *et al.* 2008, Boushaba *et al.* 2015).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κινητικότητα καθώς και η βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων μειώθηκαν σημαντικά μετά την απόψυξη των δειγμάτων σπέρματος. Σύμφωνα με τον Critser και τους συνεργάτες τους, η γλυκερόλη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τη κρυοσυντήρηση σπέρματος, έχει επιβλαβείς συνέπειες στην κινητικότητα, αν και η διαδικασία της κατάψυξης- απόψυξης φαίνεται να έχει ακόμη πιο καταστροφικές επιδράσεις (Critser *et al.* 1998). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό των ακίνητων σπερματοζωαρίων μετά τη διαδικασία της απόψυξης. Η αύξηση των ακίνητων σπερματοζωαρίων και η μείωση της βιωσιμότητας μετά την απόψυξη μπορούν να θεωρούν πιθανοί λόγοι μείωσης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Όσο αφορά τη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, ο πιο πιθανός λόγος μείωσης της φαίνεται να είναι το φυσικό και χημικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται το σπερματοζωάριο (Hammadeh *et al.* 1999). Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου εξωκυτταρικά θεωρείται ο κύριος παράγοντας

που επηρεάζει τη βιωσιμότητά του σπερματοζωαρίου (Morris *et al.* 2006). Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία για τις τοξικές επιδράσεις της γλυκερόλης όχι μόνο στην κινητικότητα και στη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων (Buhr *et al.* 2001, Gilmore *et al.* 1997).

Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση της κρυοσυντήρησης στην ακεραιότητα του DNA του σπέρματος στον άνθρωπο είναι αμφιλεγόμενα (Kalthur *et al.* 2008, Zribi *et al.* 2010, Meamar *et al.* 2012, Duru *et al.* 2001, Kadirvel *et al.* 2009, Vutyavanich *et al.* 2010). Ο SDF αποτελεί βασική παράμετρο της ανάλυσης του σπέρματος, η οποία εφαρμόζεται σε αρκετά κέντρα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Agarwal *et al.* 2017, Cho *et al.* 2017). Είναι γνωστή η θετική συσχέτιση μεταξύ του SDF και του ποσοστού αποβολής (Anifandis *et al.* 2015). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα σπερματοζωάρια με αυξημένο ποσοστό κατακερματισμένου DNA δεν μπορούν να παρέχουν ακέραιο πατρικό DNA στο αναπτυσσόμενο έμβρυο μετά τη γονιμοποίηση, με αποτέλεσμα την πιθανή πρόωρη αποβολή ή και τον εκφυλισμό του εμβρύου πριν φτάσει στο σημείο της εμφύτευσης. Επομένως, λόγω της σημαντικής συμβολής του πατρικού γενετικού υλικού στην ανάπτυξη του εμβρύου, ο κατακερματισμός του DNA θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη ως κύρια παράμετρος της λειτουργίας του σπέρματος. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της κρυοσυντήρησης στον κατακερματισμό του DNA με τη μεθοδολογία της διασποράς της χρωματίνης του σπέρματος (SCD) (Halosperm® G2 kit). Παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του ποσοστού SDF μετά την απόψυξη σε σχέση με πριν την κατάψυξη των δειγμάτων. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η πυρηνική από-συμπύκνωση έπεται της κινητικής δυσλειτουργίας, η οποία φαίνεται να είναι το πρώτο πλήγμα των σπερματοζωαρίων. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά τα σπερματοζωάρια χάνουν την ικανότητα τους να μετακινούνται και αυτό επηρεάζει ακολούθως και την ακεραιότητα του DNA τους. Επιπλέον, η αύξηση του ποσοστού SDF μετά την απόψυξη σπέρματος μπορεί να οφείλεται και στη μεθοδολογία εκτίμησης του κατακερματισμού του DNA που χρησιμοποιήθηκε. Με άλλα λόγια, ο κατακερματισμός του DNA σχετίζεται με τα πρότυπα χρώσης και τη μεθοδολογία που θα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του (Sá *et al.* 2015, Bucar *et al.* 2015). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη κατάψυξη των δειγμάτων, τα δείγματα τοποθετήθηκαν απευθείας στο υγρό άζωτο χωρίς να έχει προηγηθεί τοποθέτησή τους πάνω από το υγρό άζωτο (-80°C) σε απόσταση 15 περίπου εκατοστών για 15 λεπτά.

Αυτή η ενέργεια μπορεί να θεωρηθεί ένας άλλος παράγοντας που οδήγησε στην αύξηση του ποσοστού SDF.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η κρυοσυντήρηση έχει αρνητικές συνέπειες στα σπερματοζωάρια, τόσο στην κινητικότητα όσο και στην ακεραιότητα του DNA τους. Παρατηρήθηκε ότι η κρυοσυντήρηση με τη μεθοδολογία της υαλοποίησης κατέληξε σε μείωση της κινητικότητας αλλά και σε ανάλογη αύξηση του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων. Όσο αφορά τους μελλοντικούς στόχους, είναι καλό να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση μεταξύ του SDF και της ποιότητας του σπέρματος στη διαδικασία της κατάψυξης, εφόσον το SDF μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση και πρόγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας και πολλά δείγματα σπέρματος καταψύχονται για μελλοντική χρήση (όπως ICSI, IVF, IUI). Είναι επομένως σημαντικό να γνωρίζουμε την επίδραση της κατάψυξης στο δείγμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για λόγους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Επιπλέον, η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων θα μπορούσε να οδηγήσει στην επιβεβαίωση των υπαρχόντων αποτελεσμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agarwal A; Cho CL; Esteves SC; Majzoub A. Development of treatment strategies in men with vulnerable sperm. *Transl. Androl. Urol.* 2017; 6 (Suppl. 4): 476- 478.

Aitken RJ; Baker MA. Oxygene stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004; 16: 581-588.

Amann RP. Weakness in reports of fertility for horses and other species. *Theriogenol.* 2005; 63: 698- 715.

Andrabi SMH. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *Int. J. Agri. And Biol.* 2007; 9: 367-369.

Anifandis G; Amiridis G; Dafopoulos K; Daponte A; Dovolou E; Gavriil E; Gorgogietas V; Kachpani E; Mamuris Z; Messini CI; et al. The In Vitro Impact of the Herbicide Roundup on Human Sperm Motility and Sperm Mitochondria. *Toxics* 2017; 6; 2.

Anifandis G; Bounartzi T; Messini CI; Dafopoulos K; Markandona R; Sotiriou S; Tzavella A; Messinis IE. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ ICSI treatments. *Andrologia* 2015; 47: 295- 302.

Anifandis G; Bounartzi T; Messini CI; Dafopoulos K; Sotiriou S; Messinis IE. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®. *Arch. Gynecol. Obstet* 2014; 290: 777- 782.

Anifandis G; Katsanaki K; Lagodonti G; Messini C; Simopoulou M; Dafopoulos K; Daponte A. The effect of Glyphosate on Human Sperm Motility and Sperm DNA Fragmentation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018; 15; 1117.

Bailey JL; Bilodeau JF; Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000; 21: 1-7.

Belous AM; Bondarenko VA. Structural Changes of Biological Membranes During Cooling. *Kiev, Ukraine* 1982.

Bounartzi T; Dafopoulos K; Anifandis G; Messini CI; Koutsonikou C; Kouris S; Satra M; Sotiriou S; Vamvakopoulos N; Messinis IE. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI- ET patients. *Hum. Fertil.* 2016; 19: 56- 62.

Boushaba S; Belaaloui G. Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in algerian infertile male partners. *World J Mens Health* 2015; 33: 1- 7.

Bucar S; Gonçalves A; Rocha E; Barros A; Sousa M; Sá R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic- activated cell sorting. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32: 147- 154.

Bungum M; Bungum L; Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011; 13: 69-75.

Buhr MM; Fiser P; Bailey JL; Curtis EF. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl I* 2001; 22: 961- 969.

Cerolini S; Maldjian A; Pizzi F; Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 2001; 121: 395- 401.

Chatterjee S; Lamirande DE; Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulphhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev.* 2001; 60: 498- 506.

Chenier T; Merkies K; Leibo S; Plante C; Johnson W. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. *44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 5-6.

Cho CL; Agarwal A; Majzoub A; Esteves SC. Future direction in sperm DNA fragmentation testing. *Transl. Androl. Urol.* 2017; 6 (Suppl. 4): 525- 526.

Chohan KR; Griffin JT; Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia* 2004; 36: 321- 326.

Critser JK; Huse- Benda AR; Aaker DV; Arneson BW; Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 1998; 50: 314- 320.

Devismita D; Kumar A. Effect of cryoprotectant on optimal cooling rate during cryopreservation. *Cryobiology* 2015; 70: 53–59.

Didolkar AK; Patel PB; Roychowdhury D. Effect of aspirin on spermatogenesis in mature and immature rats. *Int J Androl* 1980; 3: 585- 593.

Donnelly ET; Steele EK; McClure N; Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1191- 1199.

Duru NK; Morshedi MS; Schuffner A; Oehninger S. Cryopreservation- thawing if fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 2001; 22: 646–651.

Dziekonska A; Fraser L; Strzezek J. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J. Anim. And Feed Sci* 2009; 18: 638–649.

Evenson DP; Darzynkiewicz Z; Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131–1133.

Evenson DP; Jost LK; Marshall D; Zinaman MJ; Clegg MJ; Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin assay as diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-1049.

Evenson DP; Larson KL; Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25–43.

Evenson, DP; Wixon R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil. Steril.* 2005; 84: 846–849.

Evgeni E; Lymberopoulos G; Touloupidis S; Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia* 2015; 47: 1166- 1174.

Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23: 1-13.

Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1977; 278: 191-205.

Fernández, JL; Gosá Ivez J. Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol. Biol.* 2002; 203: 203–216.

Fernández JL; Lourdes M; Goyanes VJ et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil. Steril.* 2005; 84: 833–842.

Finnegan DJ. Transposable elements and DNA transposition in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2: 471-477.

Friedberg EC. DNA Repair and Mutagenesis. *Washington: American society for Microbiology* 1995; 698.

Galloway SM; Deasy DA; Bean CL; Kraynak AR; Armstrong MJ; Bradley MO. Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister- chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity. *Mutat Res* 1987; 189: 15–25.

Gillan L; Maxwell WMC; Evans G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fertil. Dev* 2004; 16: 447–454.

Gilmore JA; Liu J; Gao DY; Critser JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 112- 118.

Hammadeh ME; Askari AS; Georg T; Rosenbaum P; Schmidt W. Effect of freeze- thawing procedure on chromatin stability, morphological and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 1999; 22: 155- 162.

Hammadeh ME; Szarvasy D; Zeginiadou T; Rosenbaum P; Georg T; Schmidt W. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze- thawing techniques. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 364–370.

Hess R; Bartels MJ; Pottenger LH. Ethylene glycol: An estimate of tolerable levels of exposure based on a review of animal and human data. *Arch Toxicol* 2004; 78: 671–680.

Honda S; Weigel A; Hjelmeland LM; Handa JT. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 493– 498.

Hoshi K; Katayose H; Yanagida K; Kimura Y; Sato Y. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertility and Sterility* 1996; 66: 634–639.

Januskauskas A; Zillinskas H. Bull semen evaluation post- thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija in zootechnika* 2002; 17: 1392– 2130.

Kadirvel G; Kumar S; Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen- thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci* 2009; 114: 125– 134.

Kalthur G; Adiga SK; Upadhya D; Rao S; Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril* 2008; 89: 1723– 1727.

Kalweit S; Nowak C; Obe G. Hypotonic treatment leads to chromosomal aberrations but not to sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutat Res* 1990; 245: 5– 9.

Kopeika E; Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi SMH, Cosson JJ. Coward K, Rafiee Gh. *Fish Spermatology* Oxford: Alpha Science 2008.

Kultz D; Chakravarty D. Maintenance of genomic integrity in mammalian kidney cells exposed to hyperosmotic stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 130: 421– 428.

Lessard C; Parent S; Leclerc P; Bailey JL; Sullivan R. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *J Androl.* 2000; 21: 700–707.

Lin MH; Kuo- Kuang Lee R; Li SH; Lu CH; Sun FJ; Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and Intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008; 90: 352- 359.

Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 11: 28–36.

Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347-369.

Mazur P; Cole KW. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology* 1985; 22: 509-536.

Mazur P; Katkova N; Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology* 2000; 40: 187-209.

Meamar M; Zribi N; Cambi M; Tamburrino L; Marchiani S; Filimberti E; Fino MG; Biggeri A; Menezo Y; Forti G. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new sights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertil Steril* 2012; 98: 326- 333.

Meryman HT; Williams RJ; Douglas MS. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1977; 14: 287-302.

Mohammad EH; Alixides FA; Mohammad FH. Reactive Oxygen Species and Antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *International Journal of Fertility and Sterility* 2009; 3: 87- 110.

Montjean D; Zini A; Ravel C; Bello S; Dalleac A; Copin H; et al. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology* 2015; 3: 235- 240.

Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod* 2006; 21: 2075- 2083.

Muriel L; Goyanes V; Segrelles E; Gosá Ivez J; Alvarez JG; Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J. Androl.* 2007; 28: 38–49.

Olive PL; Wlodek D; Banath JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research* 1991; 51: 4671- 4676.

Ostling O; Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 123: 291–298.

Parks JE; Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membrane. *Cryobiology* 1992; 29: 255- 266.

Peluso G; Palmieri A; Cozza PP; Morrone G; Verze P; Longo N; et al. The study of spermatid DNA fragmentation and sperm motility in infertile subjects. *Arch Ital Urol Androl* 2013; 85: 8- 13.

Polge C.; Smith A.U; Parkers A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.

Privalov PL. Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990; 25: 281- 305.

Rall WF; Fahy GM. Ice- free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575.

Royere D; Hamamah S; Nicolle JC; Lansac J. Chromatin alterations induced by freeze- thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int J Androl* 1991; 14: 328- 332.

Ruiz-Pesini E; Alvarez E; Enriquez J; Lopez- Perez M. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int. J. And.* 2001; 24: 335-340.

Sá R; Cunha M; Rocha E; Barros A; Sousa M. Sperm DNA fragmentation is related to sperm morphological staining patterns. *Reprod. Biomed. Online* 2015; 31: 506- 515.

Sakkas D; Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93: 1027-36.

Sawada Y; Ackerman D; Behrman SJ. Motility and respiration of human spermatozoa after cooling to various low temperatures. *Fertil Steril* 1967; 18: 775- 781.

Sergerie M; Laforest G; Bujan L; Bissonnette F; Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20: 3446-3451.

Sharma RK; Sabanegh E; Mahfouz R; Gupta S; Thiyagarajan A; Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010; 76: 1380-1386.

Sherman J.K. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertil Steril* 1963; 14:49-64.

Sherman J.K; Bunge R.G. Observations on Preservation of Human Spermatozoa at Low Temperatures. *Experimental Biology and Medicine* 1953; 82: 686-688.

Singh NP; McCoy MT; Tice RR; Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175: 184- 191.

Smit M; Romijn JC; Wildhagen MF; Weber RF; Dohle GR. Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertil Steril* 2010; 94: 1748- 1752.

Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73: 43–50.

Squires EL; Keith SL; Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2004, 62: 1056- 1065.

Tchir J; Acker JP. Mitochondria and membrane cryoinjury in micropatterned cells: Effects of cell-cell interactions. *Cryobiology* 2010, 61: 100- 107.

Tiitinen A. Prevention of multiple pregnancies in infertility treatment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26:829–840.

Vutyavanich T; Piromlertamorn W; Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2010; 93: 1921- 1928.

Watson PF. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod. Sci.* 2000; 60: 481- 492.

World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. Switzerland, Geneva

Zini A; Boman JM; Belzile E. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta- analysis. *Hum Reprod.* 2008; 23: 2663- 2668.

Zini A; Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 2009; 30: 219- 229.

Zribi N; Feki CN; El Euch H; Gargouri J; Bahloul A; Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010; 93: 159- 166.